



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁵ : C12Q 1/68, C07H 21/04		A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 94/19490 (43) Date de publication internationale: 1er septembre 1994 (01.09.94)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR94/00201 (22) Date de dépôt international: 24 février 1994 (24.02.94) (30) Données relatives à la priorité: 93/02127 24 février 1993 (24.02.93) FR		(81) Etats désignés: CA, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale. Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont reçues.</i>	
(71) Déposant (<i>pour tous les Etats désignés sauf US</i>): BIO MERIEUX [FR/FR]; F-69280 Marcy-l'Etoile (FR). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (<i>US seulement</i>): MABILAT, Claude [FR/FR]; 1, cours Emile-Zola, F-69100 Villeurbanne (FR). CHRISTEN, Richard [FR/FR]; 213, boulevard du Mont-boron, F-06000 Nice (FR). (74) Mandataire: TONNELLIER, Jean-Claude; Nony & Associés, 29, rue Cambacérès, F-75008 Paris (FR).			
<p>(54) Title: METHOD OF DESTABILIZATION OF THE SECONDARY INTRASTRAND STRUCTURE OF A SIMPLE STRAND POLYNUCLEOTIDE, AND CAPTURE OF SAID NUCLEOTIDE</p> <p>(54) Titre: PROCEDE DE DESTABILISATION D'UNE STRUCTURE SECONDAIRE INTRACATENAIRE D'UN POLYNUCLEOTIDE SIMPLE BRIN, ET DE CAPTURE DUDIT NUCLEOTIDE</p> <p>(57) Abstract</p> <p>Method of destabilization of the secondary intrastrand structure of a simple strand polynucleotide, and capture of said polynucleotide. The method is characterized in that a device comprising an oligonucleotide attached to a support is placed in contact with a liquid phase containing said polynucleotide, at a temperature of below 50 °C, said oligonucleotide acting as a capture probe and containing a destabilizing sequence capable of hybridizing with a non self-complementary sequence involved in the polynucleotide's secondary structure. The invention also concerns a device for carrying out said method.</p> <p>(57) Abrégé</p> <p>Procédé de déstabilisation d'une structure secondaire intracaténaire d'un polynucléotide simple brin, et de capture dudit polynucléotide, caractérisé par le fait que l'on met en contact un dispositif comprenant un oligonucléotide fixé sur un support avec une phase liquide contenant ledit polynucléotide, à une température inférieure à 50 °C, ledit oligonucléotide jouant le rôle de sonde de capture et contenant une séquence dite déstabilisante capable de s'hybrider avec une séquence non auto-complémentaire participant à ladite structure secondaire dudit polynucléotide; et dispositif pour la mise en œuvre de ce procédé.</p>			

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	GB	Royaume-Uni	MR	Mauritanie
AU	Australie	GE	Géorgie	MW	Malawi
BB	Barbade	GN	Guinée	NE	Niger
BE	Belgique	GR	Grèce	NL	Pays-Bas
BF	Burkina Faso	HU	Hongrie	NO	Norvège
BG	Bulgarie	IE	Irlande	NZ	Nouvelle-Zélande
BJ	Bénin	IT	Italie	PL	Pologne
BR	Brésil	JP	Japon	PT	Portugal
BY	Bélarus	KE	Kenya	RO	Roumanie
CA	Canada	KG	Kirghizistan	RU	Fédération de Russie
CF	République centrafricaine	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CG	Congo	KR	République de Corée	SE	Suède
CH	Suisse	KZ	Kazakhstan	SI	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SK	Slovaquie
CM	Cameroun	LK	Sri Lanka	SN	Sénégal
CN	Chine	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CS	Tchécoslovaquie	LV	Lettonie	TG	Togo
CZ	République tchèque	MC	Monaco	TJ	Tadjikistan
DE	Allemagne	MD	République de Moldova	TT	Trinité-et-Tobago
DK	Danemark	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Espagne	ML	Mali	US	Etats-Unis d'Amérique
FI	Finlande	MN	Mongolie	UZ	Ouzbékistan
FR	France			VN	Viet Nam
GA	Gabon				

Procédé de déstabilisation d'une structure secondaire intracaténaire d'un polynucléotide simple brin, et de capture dudit nucléotide.

5 L'invention a pour objet un procédé de déstabilisation d'une structure secondaire intracaténaire présente dans un polynucléotide simple brin, ce procédé étant utilisable dans une technique d'hybridation en phase solide lorsqu'un locus d'intérêt de l'acide nucléique est présent au niveau d'une structure secondaire.

L'invention concerne également un dispositif destiné à la mise en œuvre de ce procédé. L'un des avantages de ce procédé est qu'il est facilement automatisable.

10 L'hybridation des acides nucléiques par formation de liaisons hydrogène entre deux séquences complémentaires selon les lois d'appariement A-T, G-C pour l'ADN, et A-U, G-C pour l'ARN, est un phénomène bien connu.

15 Sur la base des propriétés d'hybridation des acides nucléiques, des tests ont été développés permettant de mettre en évidence et de quantifier, dans un échantillon à analyser, un acide nucléique. Dans cette technologie dite "par sondes nucléiques", la présence d'un acide nucléique dans un échantillon est confirmée en utilisant un oligonucléotide de séquence connue (la sonde) qui est complémentaire d'une séquence nucléotidique de l'acide nucléique recherché (la cible).

20 Une technique d'hybridation particulièrement intéressante est la technique dite d'hybridation sandwich qui utilise une première sonde fixée en excès sur un support solide, permettant de capturer l'acide nucléique recherché, et une seconde sonde, marquée, appelée sonde de détection, qui permet de révéler la présence de l'acide nucléique ainsi capturé. Cette technique, décrite notamment par Dunn et Hassel, Cell 12:23-36 (1977), comporte donc l'utilisation de deux sondes, 25 une sonde de capture, fixée sur un support solide, capable de s'hybrider avec une partie (ou zone de capture) d'un acide nucléique à détecter dans un échantillon, et une sonde de détection marquée, qui est complémentaire d'une autre zone de la cible, et qui permet la détection grâce à un marqueur qui peut être radioactif, enzymatique ou chimique.

30 La formation ou l'absence de formation d'un hybride entre la sonde de détection et l'acide nucléique cible est une source de renseignements importante pour le diagnostic. Par exemple, si la séquence nucléique d'intérêt est spécifique d'un genre ou d'une espèce de bactéries, la présence du genre ou de l'espèce dans un échantillon est confirmée quand la formation d'un hybride est détectée.

35 Les essais fondés sur les techniques d'hybridation peuvent donc être utilisés dans le diagnostic de maladies associées à la présence de microorganismes

pathogènes tels que bactéries, champignons ou virus. Ils trouvent également une utilisation dans l'industrie agro-alimentaire, notamment pour contrôler l'absence de contamination bactérienne.

5 Par ailleurs, la technique d'hybridation peut être utilisée dans le diagnostic des maladies génétiques.

Dans le cas de la détection d'organismes, en particulier d'organismes infectieux, dans un échantillon, l'acide nucléique-cible (ADN ou ARN) doit bien entendu comprendre au moins une séquence nucléique suffisamment spécifique de l'espèce, du genre ou de la famille de l'organisme à détecter et la sonde, 10 complémentaire de ladite séquence nucléique, doit éventuellement pouvoir reconnaître sa cible même au sein d'un milieu contenant des milliers d'autres acides nucléiques qui, dans certains cas, ne différeront de la cible que par une paire de bases. Ainsi, si la séquence nucléique recherchée est présente dans l'échantillon examiné, elle formera avec la sonde, un hybride ADN/ADN, ADN/ARN ou 15 ARN/ARN, selon le cas.

La cible peut être une molécule d'ADN simple brin (obtenue par exemple par dénaturation thermique préalable d'un ADN double brin ou par transcription inverse d'un ARN) comprenant une séquence nucléique spécifique de l'organisme à détecter.

20 La cible peut également être un ARN (ARN ribosomique, ARN de transfert, ou ARN messager).

Dans le cas de la détection de virus, la cible peut également être une molécule d'ADN ou d'ARN. Dans le cas des organismes procaryotes ou eucaryotes, on préfère souvent utiliser comme cible l'ARN ribosomique (ARNr) qui, avec les 25 protéines ribosomiques, constitue le ribosome. Celui-ci assure une fonction essentielle de la cellule, à savoir la traduction de l'ARN messager en protéines. L'ARN ribosomique, qui est retrouvé dans toutes les cellules, est un marqueur universel des êtres vivants qui possède des variations discriminantes au niveau de chaque espèce. Il a été l'objet de nombreuses recherches dont une compilation 30 récente peut être trouvée dans "The Ribosome : Structure, Function and Evolution", American Society for Microbiology, Washington D.C. (1990).

La petite sous-unité du ribosome (16-18 S) et la grande sous-unité (23-28 S) sont des molécules de choix pour étudier les relations phylogénétiques entre les différents organismes vivants, et pour procéder à leur identification. 35 Notamment Takahashi et al., Biochim. Biophys. Acta 134.124-133 (1967) ont montré la valeur taxonomique des sous-unités de l'ARN ribosomique en procédant à

des expériences d'hybridation d'ARNr de référence avec des ADN d'espèces proches. Ces expériences font ressortir un pourcentage d'homologie quantifiable, 5 reproductible et représentatif de l'éloignement taxonomique par rapport à l'espèce de référence. De même, Fox et al., International Journal of Systematic Bacteriology, 27:44-57 (1977), ont montré l'intérêt des ARNr 16 S pour la taxonomie des procaryotes.

La valeur taxonomique des séquences nucléotidiques des sous-unités de l'ARNr a été soulignée notamment par : Pace et Campbell, J. of Bacteriology 107 : 543-547 (1971), qui discutent des ARN ribosomiques de diverses espèces 10 bactériennes et d'une méthode d'hybridation pour quantifier des niveaux d'homologie entre ces espèces ; et Woese et coll., Microbiological Reviews 47 : 621-669 (1983), ainsi que Grayet et coll., Nucleic Acids Research 12 : 5837-5852 (1984), qui montrent par des comparaisons de séquences d'ARN 16S que des régions hautement 15 conservées sont intercalées avec des régions de moyenne et basse homologie, même dans le cas d'espèces proches.

En fait, les ARN ribosomiques sont présents dans tous les organismes vivants, de la bactérie à l'homme. Ils présentent une séquence nucléotidique particulière faite d'une succession de domaines caractérisés par une vitesse d'évolution variable. Dans ce dernier cas, certains domaines sont conservés chez tous 20 les organismes, ou dans des groupes d'organismes, et sont donc utilisables comme sites de complémentarité pour l'hybridation à des amores oligonucléotidiques universelles de séquençage ou d'amplification. Lorsqu'au contraire, la vitesse d'évolution d'un certain domaine est élevée, celui-ci peut être utilisé pour élaborer des sondes spécifiques, selon les cas, de l'espèce, du genre, de la famille ou du règne. 25 Les ARNr constituent une molécule très abondante dans toutes les cellules, représentant plus de 90 % des ARN totaux. Leur organisation en famille multigénique a pour résultat que leur séquence est représentative d'une espèce, ou éventuellement d'une population, plutôt que d'un individu.

L'utilisation d'ARN ribosomique, en tant que cible, pour des réactions 30 d'hybridation, peut être effectuée sur culture, par exemple sur culture bactérienne, ou sur un échantillon clinique, après transcription inverse suivie éventuellement d'une amplification enzymatique *in vitro*, en utilisant les méthodes connues, la PCR (Polymerase Chain Reaction) : Saiki et al., Science, 230:1350-1355 (1985), la TAS (Transcription Amplification System) : Kwok et al., P.N.A.S. USA, 86:1173-1177 (1989), la 3SR (Self Sustained Sequence Replication) : Guatelli et al., P.N.A.S. USA, 87:1874-1878 (1990) ou toute autre méthode d'amplification appropriée.

On peut également utiliser directement comme cible l'ADN dont l'ARN ribosomique est le produit de transcription.

Le développement de tests visant à mettre en évidence la présence d'ARNr dans un échantillon se heurte toutefois à certaines difficultés, liées 5 notamment à la conformation des molécules dans l'échantillon. En effet, la molécule d'ARNr, bien que monocaténaire, présente des structures dites secondaires. Elle contient en effet des séquences auto-complémentaires qui, dans des conditions physico-chimiques déterminées, sont capables de s'apparier localement, par 10 hybridation intramoléculaire, en se repliant sur elles-mêmes et en formant ainsi des structures dites "en épingle à cheveux" ou en "tiges-boucles" (les "boucles" correspondant à des parties de séquences non auto-complémentaires situées entre 15 deux séquences impliquées chacune dans une hybridation intramoléculaire) ; voir par exemple la Figure 1. L'existence de structures de type "tige-boucle" a été prouvée expérimentalement ; voir par exemple Noller et al., *in the Ribosome : Structure, Function and Evolution, op.cit.* Le résultat est une structure secondaire organisée comparable à celle de la figure 1 qui représente la structure secondaire de l'ARNr 16 S d'E. Coli (Gutell et al., Comparative Anatomy of the 16 S-like ribosomal RNA, Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol., 32:155-216 (1985)). Des structures secondaires analogues sont bien entendu présentes dans la forme simple brin de l'ADN dont 20 l'ARNr est le produit de transcription.

Les structures secondaires présentes dans les acides nucléiques sont à l'origine de difficultés d'hybridation des sondes oligonucléotidiques, car elles sont difficilement accessibles auxdites sondes ; voir notamment Shimomaye et Salvato, Gene Anal. Techn.. 6 : 25-28 (1989). Pour cette raison, la demande de brevet PCT 25 WO 91/00926 décrit un procédé dans lequel on choisit une région-cible de l'ARNr qui contienne le moins possible de structures secondaires. Mais un tel choix soulève des difficultés car les régions d'intérêt diagnostic, ayant varié dans le processus d'évolution, sont le plus souvent situées à l'intérieur desdites structures secondaires. On peut envisager d'éliminer les structures secondaires par dénaturation thermique 30 ou à l'aide d'agents alcalins comme l'hydroxyde de sodium. Toutefois, il a été montré qu'une partie des structures secondaires et/ou tertiaires n'était pas dénaturée dans les conditions de dénaturation utilisées habituellement ; voir notamment EP-0318245, dont les auteurs ont montré en outre que les structures secondaires résiduelles peuvent inhiber, voire bloquer la formation d'un hybride entre une sonde et une 35 séquence nucléique cible intégrée dans une structure secondaire. En outre, la dénaturation thermique n'est pas propice à la réalisation de l'hybridation dans un

appareil automatique, car elle nécessite d'opérer à des températures variées. Enfin, l'utilisation d'hydroxyde de sodium pose des problèmes de corrosion et de précision des doses introduites.

5 L'invention a pour objet un dispositif permettant la déstabilisation des structures secondaires intracaténaires d'un polynucléotide simple brin, et permettant simultanément la capture dudit polynucléotide, ce qui facilite en outre des opérations ultérieures telles que la détection par hybridation, l'amplification ou le séquençage.

10 En outre, le dispositif de l'invention peut être utilisé sans dénaturation préalable du polynucléotide cible simple brin. Le dispositif peut donc être utilisé dans un appareil automatique, fonctionnant à température fixe, par exemple à 37°C.

15 L'invention a donc pour objet un dispositif pour la déstabilisation d'une structure secondaire intracaténaire présente dans un polynucléotide simple brin, caractérisé par le fait qu'il contient un oligonucléotide fixé sur un support, ledit oligonucléotide contenant une séquence dite déstabilisante capable de s'hybrider avec une séquence non auto-complémentaire participant à ladite structure secondaire dudit polynucléotide, et par le fait qu'il est utilisable comme sonde de capture pour 20 ledit polynucléotide.

25 Autrement dit, l'oligonucléotide fixé sur un support joue à la fois le rôle de déstabilisant et le rôle de sonde de capture. Comme cela a été indiqué ci-dessus, on appelle sonde de capture un oligonucléotide fixé sur un support, et permettant l'isolement de la cible.

30 L'oligonucléotide peut être un fragment d'ADN ou d'ARN naturel, ou un oligonucléotide naturel ou de synthèse, ou un fragment d'ADN ou d'ARN de synthèse soit non modifié, soit comprenant une ou plusieurs bases modifiées telles que l'inosine, la méthyl-5-désoxycytidine, la désoxyuridine, la diméthylamino-5-désoxyuridine, la diamino-2,6-purine, la bromo-5-désoxyuridine ou toute autre autre base modifiée permettant l'hybridation. Des modifications chimiques appropriées peuvent permettre par exemple d'améliorer la résistance vis-à-vis d'une dégradation enzymatique, en particulier due aux nucléases, et d'accroître en outre le rendement d'hybridation, bien entendu sans affecter l'enchainement des bases. Des exemples en sont l'introduction entre au moins deux nucléotides d'un groupement choisi parmi les esters de diphosphate, d'alkyl- et aryl-phosphonate et de phosphorothioate, ou le remplacement d'au moins un désoxyribose par un polyamide ; voir à ce sujet P.E. Nielsen et al. *Science*, 254, 1497-1500 (1991).

35 Le support peut être un support macromoléculaire, et en particulier un support solide. Les supports utilisables sont connus en soi. Il peut s'agir par exemple

de la paroi d'un tube à essais, d'une plaque de polystyrène ou de nylon, d'un cône (par exemple en copolymère butadiène-styrène), de billes ou de microsphères de latex, etc. L'oligonucléotide déstabilisant doit être capable d'entrer en concurrence avec la séquence complémentaire de la séquence qu'il reconnaît dans la structure secondaire de la cible. Pour cette raison, la séquence reconnue par l'oligonucléotide ne doit pas consister uniquement en une partie elle-même auto-complémentaire de la cible, car la sonde oligonucléotidique comporterait alors elle aussi une séquence auto-complémentaire et se replierait sur elle-même, de sorte qu'elle ne pourrait pas jouer son rôle de sonde déstabilisante sans dénaturation préalable.

Il convient de noter qu'il n'était pas évident qu'une sonde fixée sur un support, et donc soumise à des contraintes stériques, puisse être utilisée comme moyen de déstabilisation d'une structure secondaire intracaténaire dont l'accessibilité est bien entendu fortement réduite, comme un simple examen de la figure 1 permet de le comprendre, et cela d'autant plus qu'en réalité, les polynucléotides tels que les ARNr ont une structure tertiaire qui, en général, complique encore davantage les problèmes d'accessibilité des sondes oligonucléotidiques fixées. Ce résultat est d'autant plus remarquable qu'en fait, comme cela est montré dans la partie expérimentale, il n'est même pas nécessaire d'effectuer une dénaturation préalable du polynucléotide-cible pour que le dispositif de l'invention fonctionne de manière satisfaisante.

Dans la demande de brevet EP-0318245, on a décrit des essais d'hybridation en phase liquide dans lesquels on utilise un ou plusieurs oligonucléotides auxiliaires dont la capacité d'hybridation avec une séquence impliquée dans une structure secondaire de la cible permet de favoriser l'hybridation d'une autre sonde spécifique reconnaissant une autre séquence également présente dans ladite structure secondaire. Il est indiqué dans cette demande de brevet européen que le fait de travailler en milieu hétérogène, c'est-à-dire avec fixation d'un réactif sur une phase solide, ne favorise pas l'hybridation, pour des raisons qui tiennent à l'encombrement et à l'orientation des molécules. C'est manifestement pour cette raison que les auteurs de la demande de brevet européen citée ont opté pour la réalisation d'essais en phase liquide. Il existait donc, chez les spécialistes, un préjugé contre la possibilité d'utiliser un oligonucléotide fixé sur un support solide et, malgré cela, capable de déstabiliser une structure secondaire, sans l'aide d'un oligonucléotide auxiliaire.

Pour fixer l'oligonucléotide sur le support, on peut utiliser toutes les méthodes connues telles que par exemple la fixation par établissement d'une liaison

covalente, soit directement, soit par l'intermédiaire d'un ligand lui-même fixé au support par au moins une liaison covalente ou par adsorption. On peut citer à ce propos les documents WO 88/01302 ainsi que FR-9109057 (2.679.255).

La séquence déstabilisante de l'oligonucléotide utilisé dans le 5 dispositif de l'invention doit avoir une longueur suffisante (c'est-à-dire un nombre de motifs nucléotidiques suffisant) pour provoquer la déstabilisation de la structure secondaire de la cible à une température prédéterminée.

Il est connu que la stabilité d'un duplex nucléique augmente avec le 10 nombre de bases appariées, ce qui se traduit par le fait que la température T_m (température de dissociation de 50 % des duplex) augmente, pour un oligonucléotide donné, lorsqu'on le soumet à une élongation par augmentation du nombre de motifs nucléotidiques.

La séquence oligonucléotidique déstabilisante devra donc avoir une 15 longueur suffisante pour pouvoir à la fois rompre le duplex formé par les séquences capables d'hybridation intracaténaire, par déplacement d'un des brins, et inhiber efficacement la reformation de la structure secondaire par hybridation intracaténaire, à la température à laquelle on opère. On a découvert de façon surprenante que malgré les contraintes prévisibles nées de l'utilisation d'un oligonucléotide déstabilisant fixé sur un support, il est possible d'obtenir une déstabilisation satisfaisante de la structure 20 secondaire à des températures inférieures à 50°C, et cela sans dénaturation préalable du polynucléotide-cible, tout en utilisant des oligonucléotides relativement courts, ayant par exemple de 20 à 40 nucléotides. En pratique, on peut opérer généralement entre 0 et 45°C environ, et en particulier à 37°C, ce qui représente un avantage évident.

25 L'invention a donc également pour objet un procédé de déstabilisation d'une structure secondaire intracaténaire d'un polynucléotide simple-brin et de capture dudit polynucléotide, caractérisé par le fait que l'on met en contact un dispositif tel que défini ci-dessus avec une phase liquide contenant, ou susceptible de contenir, ledit polynucléotide, à une température inférieure à 50°C. La phase liquide 30 est par exemple un échantillon biologique ou un isolat de culture dans lequel on souhaite rechercher, pour la doser ou la caractériser, une séquence polynucléotidique d'intérêt, comme cela a été rappelé dans la partie introductory ci-dessus. Par exemple, si l'on ajoute à la phase liquide un second oligonucléotide capable de s'hybrider avec une séquence autre que la séquence reconnue par la séquence déstabilisante, ce 35 second oligonucléotide pourra être utilisé, en quantité suffisante, soit comme sonde de détection (le second oligonucléotide est alors un oligonucléotide marqué), soit

comme amorce pour l'amplification ou le séquençage de la cible par élongation du second oligonucléotide.

5 Bien entendu, le second oligonucléotide devra avoir une longueur appropriée, et en particulier suffisamment courte pour assurer une spécificité à la température à laquelle on opère. Le second oligonucléotide a généralement une longueur inférieure à 25 nucléotides, en particulier de 8 à 20 nucléotides.

La séquence reconnue par le second oligonucléotide, lorsqu'il est présent, est généralement située dans la partie déstabilisée de la structure secondaire.

10 Pour effectuer l'élongation du second oligonucléotide, il convient d'ajouter à la phase liquide en quantité suffisante les nucléotides élémentaires et une polymérase telle qu'une ADN polymérase ou, lorsque la cible est un ARN ou une transcriptase inverse (ADN polymérase ARN dépendante).

15 Par utilisation de nucléotides contenant en outre des nucléotides modifiés, par exemple des nucléotides terminateurs de chaîne ou des nucléotides marqués, il est possible de synthétiser et caractériser des produits d'élongation du second oligonucléotide. L'une des applications peut être le séquençage, effectué par la méthode de Sanger ou selon toute autre méthode appropriée.

20 On peut mettre également à profit la déstabilisation de la structure secondaire pour synthétiser une séquence complémentaire de la cible par élongation de la sonde de capture, par addition à la phase liquide des nucléotides élémentaires et d'une polymérase et, dans ce cas, la sonde de capture sera bien entendu fixée par son extrémité 5'. Ici encore, il est possible de procéder à un séquençage par utilisation de nucléotides mélangés à des nucléotides modifiés.

25 On sait par ailleurs qu'il existe des polymérases capables de déplacer les brins d'un duplex pour copier l'un des deux brins : c'est le cas par exemple de la E. Coli DNA polymérase I ; voir notamment J. Sambrook et al. Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989), chap.5 page 34.

30 Lorsque l'oligonucléotide de capture est fixé au support par son extrémité 3', et que le second oligonucléotide est capable de s'hybrider avec une séquence de la cible située en aval par rapport à la séquence reconnue par la sonde de capture (c'est-à-dire avec une séquence située entre l'extrémité 3' de la cible et la séquence reconnue par l'oligonucléotide de capture), il est possible de procéder à une élongation du second oligonucléotide de façon à synthétiser une séquence complémentaire de la région de la cible située entre le second oligonucléotide et la sonde de capture, et dans le cas où l'on utilise une polymérase capable de déplacer les brins d'un duplex, l'élongation du second oligonucléotide peut se poursuivre

jusqu'au-delà de la séquence reconnue par la sonde de capture, et le produit d'elongation du second oligonucléotide se trouvera relargué en solution.

Lorsque l'oligonucléotide de capture est fixé au support par son extrémité 5', l'addition d'une polymérase dans des conditions permettant l'elongation 5 conduit alors à une elongation de l'oligonucléotide de capture. Lorsqu'un second oligonucléotide, capable de s'hybrider avec une séquence de la cible situé en aval par rapport à la séquence reconnue par l'oligonucléotide de capture, est également présent, l'addition d'une polymérase dans des conditions permettant l'elongation 10 conduit à l'elongation des deux oligonucléotides, et dans le cas où l'on utilise une polymérase capable de déplacer les brins d'un duplex, la progression de l'elongation du second oligonucléotide provoquera la déshybridation de la cible d'avec la sonde de capture (et son produit d'elongation). Le produit d'elongation de la sonde de capture sera alors sous forme monobrin et fixé au support solide, tandis que le produit d'elongation du second oligonucléotide sera relargué en solution sous la 15 forme d'un duplex formé avec la cible.

Ainsi, le procédé de la présente demande permet de réaliser facilement, tout en mettant à profit les avantages propres aux procédés en phase solide, la détection, éventuellement quantitative, la caractérisation et l'amplification 20 de séquences nucléotidiques présentes dans des structures secondaires, toutes opérations qui, jusqu'à présent, soulevaient des difficultés techniques importantes.

L'invention concerne également les dispositifs particuliers et procédés décrits ci-après dans la partie expérimentale, et notamment l'utilisation des sondes de capture particulières décrites, y compris lorsqu'elles sont utilisées avec les seconds oligonucléotides dénommés "sondes de détection" dans la partie expérimentale, c'est- 25 à-dire :

- utilisation des sondes de capture SEQ ID No. 2, 6, 8, 10, ou 12 ;
- utilisation, respectivement comme sonde de capture et comme second oligonucléotide, des couples de sondes suivants : 2 et 1 ; 6 et 5 ; 8 et 7 ; 10 et 9 ; 12 et 13 ; 12 et, en mélange, 14, 15 et 16.

30 Les exemples suivants illustrent l'invention. Dans ces exemples, on fait référence aux dessins annexés dans lesquelles:

- la Fig. 1 représente la structure secondaire de l'ARN ribosomique 16S d'E.Coli d'après Gutell R.R., B.Weiser, C.R. Woese, and H.F. Noller, 1985. Comparative anatomy of the 16S-like ribosomal RNA. Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol. 32:155-216, et

- la Fig.2 représente un détail de la Fig.1, avec des précisions sur la séquence des sondes utilisées à l'exemple 1.

Exemple 1:

5

On décrit ici un procédé fonctionnant en particulier à 37°C sans dénaturation préalable et permettant d'hybrider en phase solide l'ARNr 16S au niveau d'un locus présent dans une structure secondaire permettant de distinguer les espèces *Escherichia coli* et *Shigella* des autres espèces bactériennes.

10

La séquence des sondes utilisées est donnée dans le Tableau 1 ci-après.

Dans un premier temps, on a constaté expérimentalement que la présence de la structure secondaire empêche l'hybridation d'une sonde de détection spécifique et donc l'obtention d'un signal. La cible est la région tige-boucle de l'ARNr en position 435-500 de la figure 1. La numérotation est celle de Gutell R.R., B. Weiser, C.R.

15

Woese, and H.F. Noller, 1985. Comparative anatomy of the 16S-like ribosomal RNA. *Prog. Nucleic Acid. Res. Mol., Biol.* 32:155-216. La sonde de détection G1 du tableau 1 est complémentaire d'une partie de cette structure et est, d'après les connaissances actuelles, spécifique de l'entité taxonomique *E. coli-Shigella*.

20

L'hybridation des ARNr d'une bactérie-cible a été conduite selon le procédé de détection non-radioactif et semi-automatisé décrit dans le brevet français n° 90 07249 en utilisant une sonde de capture S8L de spécificité eubactérienne et une sonde de détection G1 conjuguée à la peroxydase. La manipulation a été conduite dans une plaque de microtitration selon le protocole suivant.

25

Dans une plaque de microtitration (Nunc 439454) est déposée une solution de 1 ng/μl de l'oligonucléotide de capture dont l'extrémité 5' a réagi avec le réactif Aminolink 2 (Applied Biosystems, Foster city , Californie) dans du PBS 3X (0.45 M NaCl 0.15 M phosphate de sodium pH 7.0). La plaque est incubée 2 h à 37°C puis lavée 3 fois avec 300 μl de PBST (PBS 1x, Tween 20:0,5 % (Merck 822184)).

30

L'ARNr cible est extrait de chaque bactérie selon la technique suivante. 1,5 ml de culture bactérienne est centrifugé et le culot repris dans 75 μl de tampon Tris (Tris 25 mM, EDTA 10 mM, saccharose 50 mM pH 8) et 25 μl de solution de lysozyme (1 mg/ml en tampon Tris). Après incubation 30 min à 37°C, 50 μl de phénol sont ajoutés et le tube est agité fortement pendant 30 secondes. On rajoute 50 μl de chloroforme et on agite à nouveau 2 secondes. Après centrifugation pendant 5 min, on récupère la phase aqueuse.

La cible constituée par 10 µl d'extrait d'ARN totaux est mélangée avec 40 µl de tampon PBS saumon (PBS-3X + ADN de sperme de saumon 10 µg/ml (Sigma D 9156)). L'ensemble est ajouté dans le puits à 50 µl d'une solution du conjugué oligonucléotide-peroxydase, constituant la sonde de détection, à la concentration de 0.1 ng/µl en oligonucléotide dans un tampon PBS-cheval (PBS 3X + 10 % serum de cheval (BioMérieux 55842)). La plaque est incubée 1 h à 37° C puis lavée par 3 fois 300 µl de PBST. Dans chaque puits, on rajoute 100 µl de substrat OPD (ortho-phénylénediamine Cambridge Medical Biotechnology ref/456) dans un tampon 0,055 M acide citrique, 0,1 M monohydrogénophosphate de sodium, pH 4,93) à la concentration de 4 mg/ml, auquel on ajoute extemporanément du peroxyde d'hydrogène à 30% dilué au 1/1000. Après 20 min de réaction l'activité enzymatique est bloquée par 100 µl d'acide sulfurique 1N et la lecture est effectuée sur Axia Microreader (BioMérieux) à 492 nm.

Les bactéries-cibles étaient notamment les suivantes :

- 50 isolats ou souches *E. coli* (dont ATCC 25290, 25922, 27165, 10536, 4157, 11775T);
 - Divers autres *Escherichia* (18 isolats) : *E. fergusonii*, *E. hermanii*, *E. vulneris* :
 - 30 *Shigella* : *S. boydii*, *S. dysenteriae* (dont ATCC 29027), *S. flexneri*, *S. sonnei* ;
 - Divers *Salmonella* (27 isolats ou souches) : *S. arizona* (dont ATCC 13314, 13323, 12325), *S. choleraesuis* (ATCC 13312), *S. gallinarum*, *S. give*, *S. paratyphi A*, *S. shonron*, *S. sophia*, *S. typhimurium* (dont ATCC 14028 et 13311), *S. spp* (ATCC 9712, 1202, 11997, 8388, 6962, 29628) ;
 - Diverses entérobactéries : *Citrobacter amalonaticus* dont ATCC 25405, *Citrobacter freundii* dont ATCC 11102, *Enterobacter cloacae* dont ATCC 13047, *Enterobacter sakazaki* dont CUETM 79104 et ATCC 29544, *Enterobacter taylorae* (CUETM 452384), *Hafnia alvei*, *Klebsiella oxytoca*, *K. pneumoniae* dont ATCC 13886 et divers autres *Klebsiella*, *Kluyvera ascorbata* ATCC 33433, *Moellerella wisconsensis* (dont CDC 182679 et 306575), *Morganella morganii*, *Proteus mirabilis*, *Proteus morganii* (dont ATCC 25830), *Proteus penneri*, *Proteus rettgeri*, *Proteus vulgaris* (dont ATCC 6380), *Providencia rettgeri*, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 35422, *Serratia grimesii* ATCC 14460, *Serratia marcescens* dont ATCC 8195 et 8100, divers autres *Serratia*, *Yersinia enterolitica* dont ATCC 23715, *Yersinia intermedia* dont ATCC 29909, *Yersinia kristensenii* dont ATCC 35669, *Yersinia pseudotuberculosis* dont ATCC 23207 et NCTC 8487 ;

- *Enterococcus faecalis*.

Résultats :

Les résultats de spécificité montrent que ce système de détection ne donne aucun signal dans les conditions indiquées. La sonde de capture S8L n'est pas en cause : en effet, si l'on remplace la sonde de détection spécifique G1 par la sonde de détection eubactérienne E220, (capture : S8L) toutes les souches d'*E. coli-Shigella*, ainsi que les autres espèces bactériennes sélectionnées donnent un résultat positif. Les résultats négatifs obtenus avec la sonde de détection G1 pour les souches *E. coli-Shigella* indiquent donc que celle-ci ne peut pas accéder à sa cible à cause de la présence, dans les conditions expérimentales utilisées, de la structure secondaire décrite dans la figure 1.

Lorsque la sonde de capture eubactérienne S8L est remplacée dans les mêmes conditions par l'oligonucléotide G3 (Tableau 1 et Figure 2) situé dans la tige-boucle de coordonnées 435-500, un signal est obtenu avec toutes les souches *E. coli* et *Shigella*. La spécificité est alors celle désirée: cette combinaison de sondes ne présente pas de réactions croisées avec les acides nucléiques, en particulier l'ARNr, de toute autre espèce bactérienne, y compris les espèces proches d'*Escherichia*, à l'exception toutefois d'*Escherichia fergusonii* qui donne un résultat positif. Ainsi, l'oligonucléotide G3 fixé sur un support solide remplit la fonction de capture et de déstabilisation. En outre, ces expériences montrent clairement que la dénaturation préalable de l'ARN n'est pas nécessaire.

L'adaptation du même système capture G3 - détection G1 sur l'automate VIDAS (marque déposée - commercialisé par la société BioMérieux SA - VITEK) a été effectuée. La paroi du puits de microplaqué est ici remplacée par le SPR ("Solid Phase Receptacle") qui est un support conique réalisé à partir d'un matériau vendu sous la dénomination K résine (copolymère butadiène-styrène) et commercialisé par la société VITEK (USA). Les divers réactifs sont disposés dans une barrette à plusieurs cuvettes et les différentes étapes se déroulent dans le SPR qui est capable d'aspirer et de refouler les réactifs et qui fait donc office de pipette. La réaction d'hybridation sandwich décrite dans le protocole ci-dessous se produit sur la paroi interne du cône.

Sur la surface interne du SPR, est fixé passivement l'oligonucléotide de capture déstabilisant comportant à son extrémité 5' le ligand Aminolink 2 (Applied Biosystems-réf.400808) à une concentration de 1 ng/μl dans un volume de 315 μl d'une solution de PBS 4x (phosphate de sodium 200 mM pH 7,0, NaCl 600 mM). Après une nuit à température ambiante ou deux heures à 37°C, les cônes sont lavés 2

fois par une solution PBS Tween, puis séchés sous vide. La barrette contient dans des cuvettes les réactifs nécessaires à la détection, c'est à dire: 200 µl d'une solution à 0,1 ng/µl du conjugué de détection oligonucléotide-phosphatase alcaline, 2 fois 600 µl de solution de lavage PBS Tween et une cuvette de substrat.

5 Dans le premier puits de la barrette, sont déposés 10 µl de l'ARN extrait dans le même tampon que pour le protocole microplaques ci-dessus.

Après incubation 30 minutes du cône par le mélange cible plus sonde de détection, le cône est lavé 2 fois par une solution de PBS Tween. 250 µl de substrat MUP (méthyl-4 umbelliféryl phosphate) en solution dans un tampon diéthanolamine 10 sont aspirés dans le cône, puis relachés dans une cuvette de lecture. L'appareil mesure le signal fluorescent exprimé en URF (unités relatives de fluorescence) de la cuvette.

On a obtenu avec ce système les mêmes résultats qu'avec les microplaques.

15 Le réactif Aminolink 2 permet d'ajouter à l'extrémité 5' de la sonde un bras comportant un groupement 6-aminohexyle. La sonde ainsi couplée à un ligand possédant un groupement polaire (amine primaire), et fixée de façon passive sur le support, procure un signal amélioré ; voir la demande FR 91 09057.

Exemple 2 :

20

On décrit ici un procédé fonctionnant en particulier à 37°C et permettant d'hybrider en phase solide l'ARNr 16S au niveau d'un locus d'intérêt discriminant les genres *Salmonella* et *Vibrio*, ce locus étant présent dans une structure secondaire différente de celle de l'exemple 1.

25

La cible comprend les deux structures secondaires de l'ARNr 16S, analogues à celles présentes aux positions 770 à 880 de la figure 1. La séquence des sondes est donnée au Tableau 1.

30

L'hybridation des ARNr de souches bactériennes a été conduite selon le protocole décrit dans l'exemple 1. Il utilise la sonde déstabilisante dSAL9-2 pour la capture et l'oligonucléotide SAL9 comme sonde de détection (conjuguée à la peroxydase). La sonde de détection SAL9 du tableau 1 est complémentaire d'une partie de la structure secondaire et doit, selon les connaissances actuelles, être spécifique de l'entité taxonomique genre *Salmonella*.

35

Les bactéries-cibles étaient notamment les suivantes :
- 20 isolats ou souches de *Salmonella arizoniae* dont ATCC 13314, 13323 et 12325 ;

- les autres *Salmonella* déjà utilisés à l'exemple 1 ;
- divers autres *Salmonella*, et notamment : *S. bakou*, *S. derby*, *S. enteritidis*, *S. gallinarum*, *S. paratyphi A*, *B* et *C*, *S. panama*, *S. pullorum*, *S. thomson* ;
- diverses enterobactéries (34) des genres *Citrobacter*, *Enterobacter*,
5 *Klebsiella*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Serratia* ; dont ATCC 11102, 13047, 29544, 13886, 6380, 35422, 8195, déjà cités et 25830 (*Proteus morganii*) ;
- divers *E. coli* dont ATCC 27165 et 4157
- divers *Shigella* dont ATCC 11060
- divers autres *Escherichia* (*blattae* ATCC 29907T, *fergusonii*, *hermanii*,
10 *vulgaris*) ;
- divers *Vibrio* (*anguillarum*, *harveyi*), *Aeromonas* et *Pleisiomonas*.

Les résultats obtenus indiquent que la combinaison de sondes utilisée est spécifique des genres *Salmonella* et d'au moins une espèce du genre *Vibrio* (Il s'agit de *Vibrio anguillarum*). Elle ne présente pas de réactions croisées avec les acides nucléiques, en particulier l'ARNr, des autres espèces bactériennes, y compris les espèces proches de ces deux genres. Ceci est contrôlé par le fait qu'une hybridation avec la sonde de capture S8L de spécificité eubactérienne, et la sonde de détection E220 de spécificité eubactérienne est positive avec les souches non-*Salmonella* et non-*Vibrio*.

20 Il convient de remarquer que la sonde SAL9 ne diffère de la séquence correspondante chez *Escherichia coli* (Fig.1) que par un seul nucléotide. La sonde SAL9 est cependant suffisamment spécifique et donne un résultat négatif pour *E. coli*.

25 L'adaptation de la même combinaison de sondes sur l'automate VIDAS (bioMérieux S.A., France) a permis l'obtention des mêmes résultats qu'en microplaques.

Exemple 3 :

30 On décrit ici un procédé fonctionnant en particulier à 37°C et permettant d'hybrider en phase solide l'ARN r 16S au niveau d'un locus d'intérêt discriminant l'espèce *Listeria monocytogenes*, ce locus étant présent dans une structure secondaire de l'ARNr 16S, analogue à celle présente entre les positions 1235 et 1300 de la figure 1.

35 L'hybridation des ARNr de souches bactériennes a été conduite selon le protocole décrit dans l'exemple 1, à l'exception de l'extraction de l'ARN r cible qui

est effectuée de la manière suivante : 1,5 ml de culture bactérienne est centrifugé et le culot repris dans 75 µl de tampon Tris (Tris 50 mM, EDTA 10 mM, saccharose 25 % pH 8) et 25 µl de solution de mutanolysine (Sigma) (1 mg/ml en tampon Tris) et de lysozyme (1 mg/ml en tampon Tris). Après incubation 30 min à 37°C, 50 µl de phénol sont ajoutés et le tube est agité fortement pendant 30 secondes. On rajoute 50 µl de chloroforme et on agite à nouveau pendant 2 secondes. Après centrifugation pendant 5 min, on récupère la phase aqueuse.

5 Ce protocole utilise la sonde déstabilisante RL1 pour la capture et l'oligonucléotide RL2 comme sonde de détection (conjuguée à la peroxydase). La 10 sonde de détection RL2 du tableau 1 est complémentaire d'une partie de cette structure et devrait, selon les connaissances actuelles, être spécifiques de *Listeria monocytogenes*.

15 Les bactéries-cibles étaient les suivantes :
- onze isolats de *Listeria monocytogenes* ;
- trois *Listeria grayi* dont ATCC 19120, quatre *Listeria innocua*, trois
Listeria murrayi dont CCM 5990 (CCUG 4984), trois *Listeria ivanovii*, quatre
Listeria seeligeri dont CIP 100100 (CCUG 15530), trois *Listeria spp*, trois *Listeria welshimeri* dont CIP 8149 (CCUG 15529).

20 Les résultats obtenus montrent que cette combinaison de sondes est spécifique pour *Listeria monocytogenes*. Elle ne présente pas de réactions croisées avec les acides nucléiques, en particulier l'ARNr, de toute autre espèce bactérienne testée, y compris les espèces proches, tel *Listeria innocua*.

25 L'adaptation de la même combinaison de sondes sur l'automate VIDAS (bioMérieux S.A., France) a permis d'observer les mêmes résultats qu'en microplaques.

Exemple 4 :

30 On décrit ici un procédé fonctionnant en particulier à 37°C et permettant d'hybrider en phase solide l'ARNr 16S au niveau d'un locus d'intérêt discriminant l'espèce *Chlamydia trachomatis*, ce locus étant dans une structure secondaire analogue à celle située entre les positions 585 et 655 de la figure 1.

35 L'hybridation des ARNr de souches bactériennes a été conduite selon le protocole décrit dans l'exemple 1.

35 L'hybridation utilise la sonde déstabilisante dCT4 pour la capture et l'oligonucléotide CT3 comme sonde de détection (conjuguée à la peroxydase). La

sonde de détection CT3 du tableau 1 est complémentaire d'une partie de cette structure et devrait, selon les connaissances actuelles, être spécifique de *Chlamydia trachomatis*.

Les bactéries-cibles étaient les suivantes :

5 - quatre isolats de *Chlamydia trachomatis* répondant respectivement à la classification Serovar Ba, D, K et L2 ; Wang S.P. et al., 1975, *J.Clin.Microbiol.* 1:250-255.

10 - divers autres *Chlamydia* dont *Chlamydia Pneumoniae* et *Chlamydia psittaci* ;

15 - diverses souches non-*Chlamydiae* des genres *Acinetobacter*, *Achromobacter*, *Aeromonas*, *Bacillus*, *Branhamella*, *Candida*, *Chromobacter*, *Enterobacter*, *Enterococcus*, *Haemophilus*, *Klebsiella*, *Escherichia*, *Lactobacillus*, *Listeria*, *Micrococcus*, *Neisseria*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Serratia*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*.

20 15 Les résultats obtenus montrent que cette combinaison de sondes est spécifique de *Chlamydia trachomatis*. Elle ne présente pas de réactions croisées avec les acides nucléiques, en particulier l'ARNr, de toute autre espèce bactérienne testée, y compris les espèces proches, tel *Chlamydia psittaci*.

25 20 L'adaptation de la même combinaison de sondes sur l'automate VIDAS (bioMérieux S.A., France) a permis d'observer les mêmes résultats qu'en microplaqué.

Exemple 5 :

25 On décrit ici un procédé fonctionnant en particulier à 37°C et permettant d'hybrider en phase solide l'ARNr 16S au niveau d'un locus d'intérêt discriminant diverses espèces du genre *Mycobacterium*, ce locus étant présent dans une structure secondaire analogue à celle située entre les positions 140-230 de la figure 1.

30 30 L'hybridation des ARNr des souches bactériennes testées a été conduite selon le protocole décrit dans l'exemple 1, à l'exception de l'extraction de l'ARNr cible effectuée selon le protocole de base pour l'extraction de l'ARN des bactéries à Gram positif décrit dans "Current Protocols in Molecular Biology" 1987, Ausubel FM et al., Wiley interscience, New York.

35 35 Le test d'hybridation utilise la sonde déstabilisante d'TB1 pour la capture et l'oligonucléotide bovis 310 comme sonde de détection (conjuguée à la peroxydase). La sonde de détection bovis 310 du tableau 1 est complémentaire d'une partie de la

structure secondaire et devrait, d'après les connaissances actuelles, être spécifique du groupe taxonomique *tuberculosis* regroupant *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti*.

Les bactéries-cibles étaient les suivantes :

5 - 27 isolats ou souches de *Mycobacterium tuberculosis* dont ATCC 27294 et NCTC 7417 ;
- 5 souches ou isolats de *Mycobacterium bovis* dont ATCC 19210 et *M. bovis* BCG (Copenhague 1077) ;
- diverses souches de *Mycobacterium avium* et *intracellulare* dont ATCC 10 35716, 29555, 35764, 35847, 35770 ;
- divers *Mycobacterium* (*chelonae*, *diernoferi*, *flavescens*, *fortuitum*, *gastri*, *gordonae*, *kansasii*, *lactis*, *marinum*, *non chromogenicum*, *phlei*, *scrofulaceum*, *simiae*, *smegmatis*, *szulgai*, *terrae*, *triviale*, *xenopi*, *vaccae*) dont ATCC 14472, 14470, 12478, 19981, 25275, 35799, 15755 et 23292 ;
15 - Non-mycobactéries : *Actinomadura madurae*, *Nocardia asteroides* ATCC 3308, *Nocardia brasiliensis* ATCC 19296, *Rhodococcus aichiensis* et *Rhodococcus sputi*.

20 Les résultats obtenus montrent que cette combinaison de sondes est spécifique de *Mycobacterium tuberculosis*. Elle ne présente pas de réactions croisées avec les acides nucléiques, en particulier l'ARNr, des autres espèces bactériennes, y compris les autres espèces du genre *Mycobacterium*, alors même que l'ARNr de ces souches est bien disponible pour l'hybridation comme le confirme l'hybridation observée avec la sonde de capture S8M de spécificité eubactérienne, et la sonde de détection E220 de spécificité eubactérienne.

25 L'adaptation de la même combinaison de sondes sur l'automate VIDAS (bioMérieux S.A., France) permet d'obtenir les mêmes résultats qu'en microplaques.

30 De la même manière, il est possible de définir des sondes spécifiques du groupe taxonomique complexe *Mycobacterium avium*-*M. intracellulare* encore appelé "MAI". Le test d'hybridation utilise la sonde déstabilisante d'TB1 et le mélange des sondes de détection MAI 1, MAI 2, MAI 3 (tableau 1).

TABLEAU 1

Appellation	Séquence	Origine	SEQ ID No.
G1	TCAATGAGCAAAGGTAA		1
G3	TTAACCTTACTCCTCTCCCGCTG	E. Coli	2
S8L	TCTACGCATTTACCGCTACAC		3
E220	TCTAATCCTGTTGCTCC	Eubactéries	4
SAL9	CCAAGTAGACATCG		5
dSAL9-2	TTAAGGGCGTGGACTACACAGGGTATCTAA	Salmonella sp.	6
RL2	ATAGTTTATGGATTAGC		7
RL1	CTTTGTACTATCCATTGTAT	L.monocytogenes	8
CT3	CGTTACTCGATGCCAAATA		9
dCT4	TCGCCACATTCGGTATTAAGCGGCCGTT	Chl.trachomatis	10
bovis	ACCAACAAGACATGCAATCCCGTG		11
dTB1	GGTCCTATCCGGTATTAGACCCAGTTCC	M. tuberculosis	13
S8M	TCTGGCATTCGACCACGCTACAC	Mycobacterium sp.	12
MAI 1	ACCAAGAAGACATGCGTCTTG	Eubactéries	11
MAI 2	ACCTAAAGACATGCGCCTAA		13
MAI 3	ACCAAAAGACATGCGTCTAA	M. avium intracellulare	15
			16

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

REVENDICATIONS

1. Dispositif pour la déstabilisation d'une structure secondaire intracaténaire présente dans un polynucléotide simple brin, caractérisé par le fait qu'il 5 contient un oligonucléotide fixé sur un support solide, ledit oligonucléotide contenant une séquence dite déstabilisante capable de s'hybrider avec une séquence non auto-complémentaire participant à ladite structure secondaire dudit polynucléotide, et par le fait qu'il est utilisable comme sonde de capture pour ledit polynucléotide.
- 10 2. Dispositif selon la revendication 1, caractérisé par le fait que ledit support est un support macromoléculaire.
3. Dispositif selon la revendication 1, caractérisé par le fait que ledit polynucléotide est un ARN.
- 15 4. Dispositif selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé par le fait que ladite séquence déstabilisante a une longueur suffisante pour provoquer la déstabilisation de ladite structure secondaire à une température pré-déterminée, inférieure à 50°C, choisie en particulier de 0 à 45°C.
5. Dispositif selon la revendication précédente, caractérisé par le fait que ladite séquence déstabilisante contient de 20 à 40 nucléotides.
- 20 6. Dispositif selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé par le fait que ledit oligonucléotide est choisi parmi ceux ayant les séquences SEQ ID No 2, 6, 8, 10 et 12.
- 25 7. Procédé de déstabilisation d'une structure secondaire intracaténaire d'un polynucléotide simple brin, et de capture dudit polynucléotide, caractérisé par le fait que l'on met en contact un dispositif tel que défini dans l'une quelconque des revendications précédentes avec une phase liquide contenant ledit polynucléotide, à une température inférieure à 50°C, ledit oligonucléotide jouant le rôle de sonde de capture.
- 30 8. Procédé selon la revendication 7, caractérisé par le fait que ladite température est 37°C.
9. Procédé selon la revendication 7 ou 8, caractérisé par le fait que l'on opère sans dénaturation préalable dudit polynucléotide.
- 35 10. Procédé selon l'une quelconque des revendications 7 à 9, caractérisé par le fait que ladite phase liquide contient en outre un second oligonucléotide capable de s'hybrider avec une séquence dudit polynucléotide autre que la séquence reconnue par ladite séquence déstabilisante.

11. Procédé selon la revendication précédente, caractérisé par le fait que ledit second oligonucléotide est capable de s'hybrider avec une séquence participant à ladite structure secondaire dudit polynucléotide.

5 12. Procédé selon la revendication 10 ou 11, caractérisé par le fait que ledit second oligonucléotide est marqué.

13. Procédé selon l'une quelconque des revendications 10 à 12, caractérisé par le fait que ladite phase liquide contient en outre une polymérase et des nucléotides, et que l'on effectue une elongation dudit second oligonucléotide.

10 14. Procédé selon l'une quelconque des revendications 7 à 12, caractérisé par le fait que ladite phase liquide contient en outre une polymérase et des nucléotides, et que l'on effectue une elongation de la sonde de capture, ou une elongation de la sonde de capture et du second oligonucléotide.

15 15. Procédé selon la revendication 13 ou 14, caractérisé par le fait que la phase liquide contient en outre des nucléotides modifiés.

16. Procédé selon la revendication précédente, caractérisé par le fait que lesdits nucléotides modifiés sont des nucléotides terminateurs de chaîne ou des nucléotides marqués.

20 17. Procédé selon l'une quelconque des revendications 7 à 16, caractérisé par le fait que ladite sonde de capture est choisie parmi celles ayant les séquences SEQ ID No 2, 6, 8, 10 et 12.

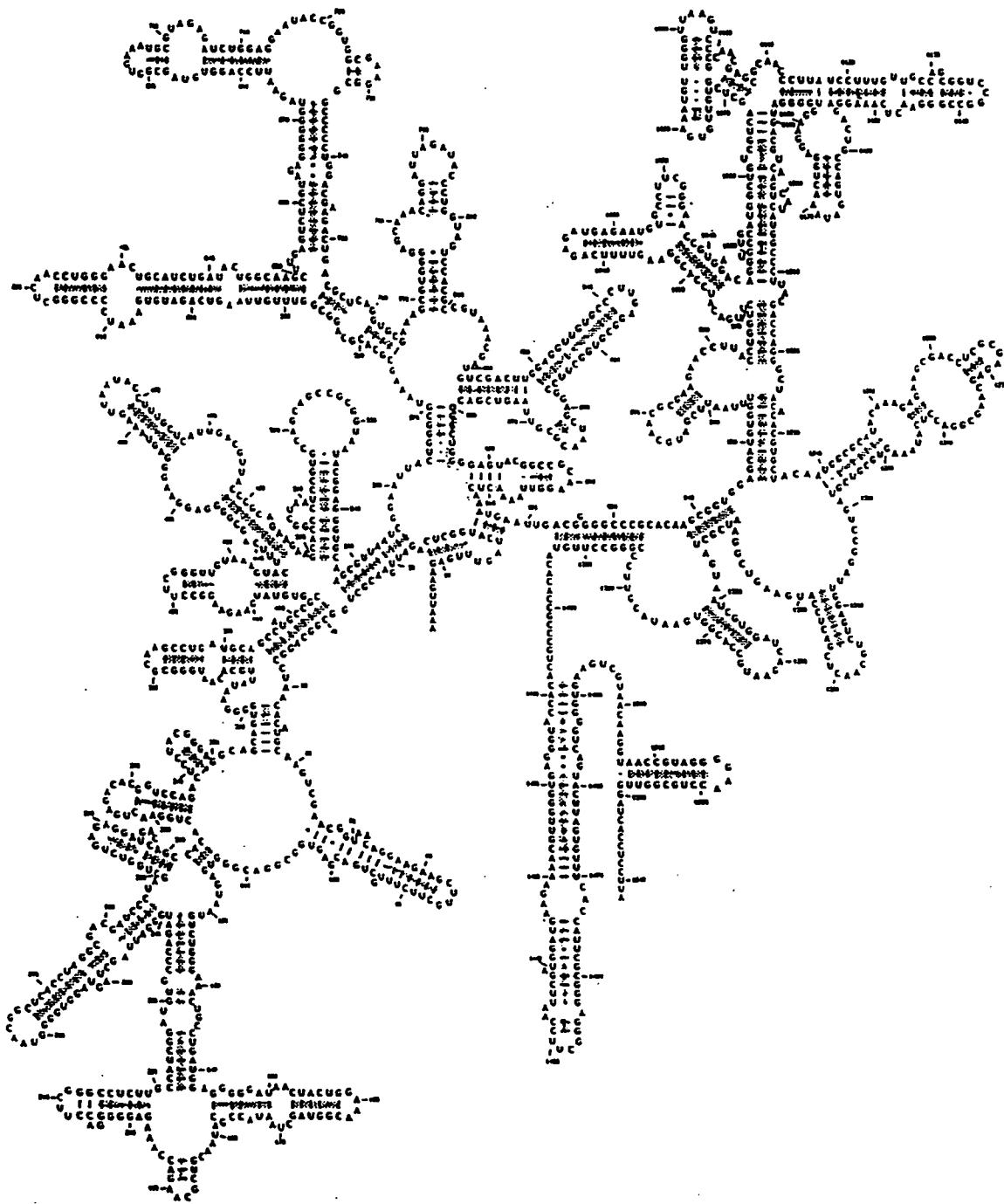
18. Procédé selon la revendication précédente, caractérisé par le fait que l'on utilise comme sonde de capture et comme second oligonucléotide, respectivement, les oligonucléotides choisis parmi ceux ayant les séquences SEQ ID No. :

25 - 2 et 1
- 6 et 5
- 8 et 7
- 10 et 9
- 12 et 13

30 - 12 et, en mélange, 14, 15 et 16.

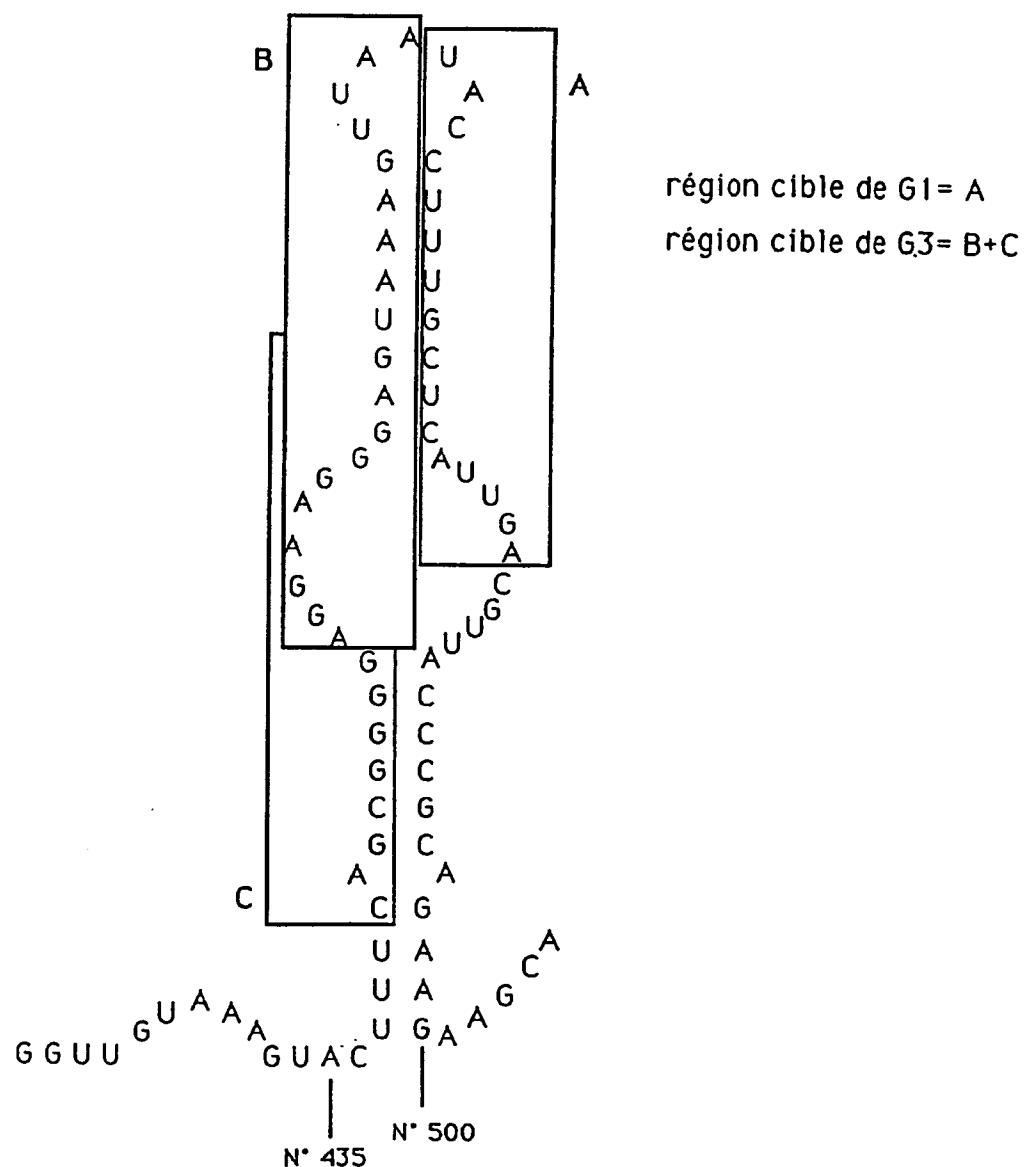
1/2

FIGURE 1



2 / 2

FIGURE 2



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR 94/00201A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 5 C12Q1/68 C07H21/04

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 5 C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO,A,90 14442 (GENE-TRAK SYSTEMS) 29 November 1990 see page 21 - page 24	1-12
Y	---	13-16
Y	WO,A,91 19812 (BIO MERIEUX) 26 December 1991 see the whole document	1-12
Y	EP,A,0 318 245 (M.L. TECHNOLOGY VENTURES, L.P.) 31 May 1989 cited in the application see the whole document	1-16
Y	EP,A,0 374 665 (MOLECULAR DIAGNOSTICS) 27 June 1990 see claims 1-10; figure 1	13-16
	---	-/--

 Further documents are listed in the continuation of box C. Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- 'A' document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- 'B' earlier document but published on or after the international filing date
- 'L' document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- 'O' document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- 'P' document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- 'T' later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- 'X' document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- 'Y' document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- '&' document member of the same patent family

1

Date of the actual completion of the international search

23 June 1994

Date of mailing of the international search report

08.07.94

Name and mailing address of the ISA
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Osborne, H

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR 94/00201

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO,A,91 08307 (MICROPROBE CORP) 13 June 1991 ---	
P,Y	EP,A,0 546 590 (EASTMAN KODAK COMPANY) 16 June 1993 see page 5 - page 7 -----	1-16

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR 94/00201

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO-A-9014442	29-11-90	AU-A-	5966990	18-12-90
		CA-A-	2031490	25-11-90
		EP-A-	0426843	15-05-91
		JP-T-	4500316	23-01-92
		US-A-	5217862	08-06-93
WO-A-9119812	26-12-91	FR-A-	2663040	13-12-91
		AU-A-	7995391	07-01-92
		CA-A-	2059657	12-12-91
		EP-A-	0486661	27-05-92
		JP-T-	5501957	15-04-93
EP-A-0318245	31-05-89	US-A-	5030557	09-07-91
		AU-A-	2611288	14-06-89
		CA-A-	1319336	22-06-93
		JP-T-	2502250	26-07-90
		WO-A-	8904876	01-06-89
EP-A-0374665	27-06-90	AU-A-	3716293	01-07-93
		AU-A-	4714489	28-06-90
		CA-A-	2004326	23-06-90
		JP-A-	3043099	25-02-91
WO-A-9108307	13-06-91	EP-A-	0504321	23-09-92
EP-A-0546590	16-06-93	CA-A-	2075683	03-04-93
		JP-A-	5211899	24-08-93

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Date Internationale No
PCT/FR 94/00201A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
C1B 5 C12Q1/68 C07H21/04

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)
C1B 5 C12Q

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	WO,A,90 14442 (GENE-TRAK SYSTEMS) 29 Novembre 1990 voir page 21 - page 24	1-12
Y	---	13-16
Y	WO,A,91 19812 (BIO MERIEUX) 26 Décembre 1991 voir le document en entier ---	1-12
Y	EP,A,0 318 245 (M.L. TECHNOLOGY VENTURES, L.P.) 31 Mai 1989 cité dans la demande voir le document en entier ---	1-16
Y	EP,A,0 374 665 (MOLECULAR DIAGNOSTICS) 27 Juin 1990 voir revendications 1-10; figure 1 ---	13-16
	-/-	

 Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré seulement
- "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- "&" document qui fait partie de la même famille de brevets

1

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

23 Juin 1994

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

08.07.94

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Osborne, H

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale N°
PCT/FR 94/00201

C(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		no. des revendications visées
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	
A	WO,A,91 08307 (MICROPROBE CORP) 13 Juin 1991 ----	
P,Y	EP,A,0 546 590 (EASTMAN KODAK COMPANY) 16 Juin 1993 voir page 5 - page 7 -----	1-16

1

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dép. de l'Int. No
PCT/FR 94/00201

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)		Date de publication
WO-A-9014442	29-11-90	AU-A- CA-A- EP-A- JP-T- US-A-	5966990 2031490 0426843 4500316 5217862	18-12-90 25-11-90 15-05-91 23-01-92 08-06-93
WO-A-9119812	26-12-91	FR-A- AU-A- CA-A- EP-A- JP-T-	2663040 7995391 2059657 0486661 5501957	13-12-91 07-01-92 12-12-91 27-05-92 15-04-93
EP-A-0318245	31-05-89	US-A- AU-A- CA-A- JP-T- WO-A-	5030557 2611288 1319336 2502250 8904876	09-07-91 14-06-89 22-06-93 26-07-90 01-06-89
EP-A-0374665	27-06-90	AU-A- AU-A- CA-A- JP-A-	3716293 4714489 2004326 3043099	01-07-93 28-06-90 23-06-90 25-02-91
WO-A-9108307	13-06-91	EP-A-	0504321	23-09-92
EP-A-0546590	16-06-93	CA-A- JP-A-	2075683 5211899	03-04-93 24-08-93